

氏 名	塩 見 真 由 美
(ふりがな)	(しおみ まゆみ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成26年1月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Sevoflurane induces cardioprotection through reactive oxygen species-mediated upregulation of autophagy in isolated guinea pig hearts (モルモット摘出心において、セボフルランは活性酸素を介するオートファジーのアップレギュレーションにより、心筋保護を誘導する)
論文審査委員	(主) 教授 石 坂 信 和 教授 浮 村 聡 教授 窪 田 隆 裕

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 《目 的》

揮発性麻酔薬は虚血心筋保護作用を有し、特に揮発性麻酔薬セボフルランを虚血前に負荷すると、心筋の虚血再灌流障害を軽減し、臨床的にも術後の心機能を改善できる。これを、麻酔プレコンディショニングという。この細胞内メカニズムについて種々の因子、経路が提唱されているが、その中の一つに活性酸素が関与するといわれている。セボフルランの投与により生じる少量の活性酸素は、シグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして働き、細胞内のエネルギーセンサーである 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) を介して、心筋を保護するとも報告されている。一方、AMPK は細胞のホメオスタシスに重要であるオートファジーに必須の酵素でもある。そこで、我々は麻酔プレコンディショニン

グのメカニズムの一つである活性酸素がオートファジーを介してその効果を発揮するか検討した。

#### 《対象と方法》

雄、成熟モルモット 66 匹 (12-13 週齢) を用いて、ペントバルビタール (60mg/kg 腹腔内投与) による深麻酔下に、心臓を摘出した。これを Langendorff 灌流装置で灌流し、20 分間安定させた後、30 分の全虚血、120 分の再灌流を行った (CTL 群)。麻酔プレコンディショニングとして、虚血前に 2%セボフルランを 10 分間投与した群を SEVO 群とした。また、虚血 30 分前から、活性酸素消去剤 n-(2-mercaptopropionyl)glycine (MPG, 1mmol/L) を投与した群を MPG 群、SEVO 群に MPG を添加したものを SEVO+MPG 群とした。血行動態に関しては、左心室圧 (mmHg)、左心室終末拡張期圧 (mmHg) を測定した。冠灌流量 (ml/min) は、右室からの流出量で算出した。再灌流 120 分後、心臓を水平方向にスライスして 1% triphenyltetrazolium chloride にて 10 分間 37 度で染色し、梗塞サイズを同定した。また、心筋組織を採取し電子顕微鏡にてオートファゴソームの数を測定した (number/100 $\mu$ m<sup>2</sup>)。ウエスタンブロット法で、オートファジー関連蛋白 (microtubule-associated protein light chain I and II: LC3-I, II) と AMPK の発現について検討した。

#### 《結果》

血行動態は、CTL 群で再灌流後、左心室圧が低く心機能が低下していたが、SEVO 群、MPG 群、SEVO+MPG 群は左心室圧が高く心機能が保持されていた。左心室終末拡張期圧は SEVO 群で CTL 群に比べ有意に低かった。また、冠灌流量は全てのグループ間で有意な差はなかった。梗塞サイズは、SEVO 群で CTL 群に比し、およそ 50%減少した (SEVO 群: 25 $\pm$ 8% vs. CTL 群: 48 $\pm$ 6%, p<0.05)。その保護効果は、MPG 付加により消失した (SEVO 群: 25 $\pm$ 8% vs. SEVO+MPG 群: 36 $\pm$ 10%, p<0.05)。また MPG 群は、CTL 群に比して梗塞サイズは小さかった (MPG 群: 39 $\pm$ 8% vs. CTL 群: 48 $\pm$ 6%, p<0.05)。電子顕微鏡において

は、CTL 群に比して、SEVO 群でオートファゴソームの数は多く、SEVO+MPG 群では、その数が減少した。ウェスタンブロット法では、LC3-II/I 比、AMPK のリン酸化が SEVO 群で有意に増加し、これらの効果は MPG によって消失した。

## 《考 察》

麻酔プレコンディショニングとは心筋に対し、セボフルランを虚血前に投与すると、心筋保護効果を誘発する現象であるが、本研究では、梗塞サイズにおいてその心筋保護効果が活性酸素消去剤 MPG を付加したところ消失した。この実験結果は麻酔プレコンディショニングに少量の活性酸素の生成が重要であるという報告と一致する。また、MPG 群で CTL 群に比べ有意に梗塞サイズが縮小したのは、心筋障害を誘発する過剰な活性酸素を除去したためと考えられる。電子顕微鏡では CTL 群に比して、SEVO 群で、オートファゴソームが多く観察された。このオートファジーのアップレギュレーションは、MPG で消失した。ウェスタンブロットでは LC3-II/I 比（オートファジーのマーカー）と AMPK のリン酸化が麻酔プレコンディショニングにより増加し、MPG によって、その効果は消失した。以上より、麻酔プレコンディショニングでは、セボフルランは少量の活性酸素を生成することを介して、オートファジー活性をアップレギュレートすることが示唆された。

活性酸素は、麻酔プレコンディショニングにおいて重要な役割を果たすこと、オートファジーに関連して心筋保護効果を惹起することが報告されている。本研究はセボフルランによる心筋保護に、この二つのカスケードがリンクしていることを初めて明らかにした。

## 《結 論》

セボフルランは活性酸素を介するオートファジーのアップレギュレーションにより、心筋保護を誘導する。麻酔プレコンディショニングによる多様なシグナリング経路や、細胞保護メカニズムを解明すれば、心疾患のある患者の麻酔を含めた周術期管理に大きく貢献する可能性があると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

揮発性麻酔薬セボフルランの心筋虚血前の投与は、再灌流による心筋障害を軽減することが知られており、麻酔プレコンディショニングと呼ばれている。

申請者は、セボフルランによる麻酔プレコンディショニングのメカニズムとして、活性酸素によるオートファジーの促進があるのではないかと、という仮説のもと研究を行っている。モルモットの心臓を Langendorff 体外灌流装置にて維持したのち、global ischemia-再灌流後の、心機能、梗塞サイズの検討を行い、さらに、オートファジーについては、電子顕微鏡による形態的検討、ウエスタンブロット法による関連蛋白の発現の検討を行っている。

本研究では、虚血前のセボフルランの投与は梗塞サイズを縮小したが、その効果は活性酸素消去剤である MPG の投与で消失した。セボフルランの投与により、オートファゴソームが多く出現するが、MPG の投与はその数も減少した。ウエスタンブロット法では、オートファジー関連蛋白がセボフルランで有意に増加し、やはり MPG によって抑制された。以上により、セボフルランは活性酸素を介するオートファジーのアップレギュレーションにより、心筋保護を誘導すると結論づけている。

麻酔プレコンディショニングにおいて活性酸素は重要なメディエーターであり、また活性酸素はオートファジーに関連して心筋を保護することについてはすでに報告がある。しかし、セボフルランによる心筋保護に、この2つのカスケードが関与している可能性を明らかにしたことは、本研究の新規性であると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Anesthesia 2013 Dec 12 doi: 10.1007/s00540-013-1755-9  
in press 〈オンライン掲載〉